

B1

OPI DATE 20/10/98 APPLN. ID 64184/98
 AOJP DATE 03/12/98 PCT NUMBER PCT/JP98/01146

PC



AU9864184



(51) 国際特許分類6
 C12N 15/12, C12Q 1/68

A1

(11) 国際公開番号

WO98/42835

(43) 国際公開日

1998年10月1日(01.10.98)

(21) 国際出願番号

PCT/JP98/01146

(22) 国際出願日

1998年3月18日(18.03.98)

(30) 優先権データ

特願平9/93044

1997年3月26日(26.03.97)

JP

(81) 指定国 AU, CA, CN, ID, KR, MX, SG, US, 欧州特許
 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,
 PT, SE).

添付公開書類

国際調査報告書

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）

大塚製薬株式会社

'OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP)

〒101-0048 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP)

(72) 発明者；および

(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）

時野隆至(TOKINO, Takashi)(JP/JP)

〒064-0806 北海道札幌市中央区南六条西18丁目3-14

Hokkaido, (JP)

中村祐輔(NAKAMURA, Yusuke)(JP/JP)

〒226-0000 神奈川県横浜市緑区あざみ野1-17-33

Kanagawa, (JP)

(74) 代理人

弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.)

〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号

共同ビル Tokyo, (JP)

(54) Title: HUMAN GENES

(54) 発明の名称 ヒト遺伝子

(57) Abstract

Novel human genes usable in gene diagnosis and development of new therapeutics. Specifically, human genes containing a base sequence encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or a part of the same, in particular, ones which are under the specific transcriptional regulation by a tumor suppressor gene p53.

१०८
विश्वास निष्ठा विश्वास
विश्वास निष्ठा विश्वास
विश्वास निष्ठा विश्वास

१०९
विश्वास निष्ठा विश्वास
विश्वास निष्ठा विश्वास
विश्वास निष्ठा विश्वास

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO98/42835 (43) 国際公開日 1998年10月1日(01.10.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01146 (22) 国際出願日 1998年3月18日(18.03.98) (30) 依先権データ 特願平9/93044 1997年3月26日(26.03.97) JP (71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒101-0048 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 時野隆至(TOKINO, Takashi)[JP/JP] 〒064-0806 北海道札幌市中央区南六条西18丁目3-14 Hokkaido, (JP) 中村祐輔(NAKAMURA, Yusuke)[JP/JP] 〒226-0000 神奈川県横浜市緑区あざみ野1-17-33 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo, (JP)	(81) 指定国 AU, CA, CN, ID, KR, MX, SG, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開文類 国際調査報告書	
(54) Title: HUMAN GENES (54) 発明の名称 ヒト遺伝子 (57) Abstract Novel human genes usable in gene diagnosis and development of new therapeutics. Specifically, human genes containing a base sequence encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or a part of the same, in particular, ones which are under the specific transcriptional regulation by a tumor suppressor gene p53.		

(57)要約

特に遺伝子診断並びに新しい治療法の開発に利用できる新規なヒト遺伝子を提供するものである。

配列番号：1で示されるアミノ酸配列の全部又は一部をコードする塩基配列を含むヒト遺伝子、特に癌抑制遺伝子 p 5 3 による特異的な転写制御下にある上記遺伝子。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL アルバニア	FI フィンランド	LR リベリア	SK スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LS レソト	SL シニラ・レオネ
AT オーストリア	GA ガボン	LT リトアニア	SN セネガル
AU オーストラリア	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SZ スウェーデン
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LV ラトヴィア	TD ティード
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	MC モナコ	TG トーゴー
BB バンコク	GH ガーナ	MD モルドヴァ	TJ クジキスタン
BE ベルギー	GM ガンビア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BF ブルキナ・ファン	GN ギニア	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BC ブルガリア	GW ギニア・ビサウ	共和国	TT ドミニカ共和国・トバゴ
BJ ベナン	GR ギリシャ	ML マリ	UA ウクライナ
BR ブラジル	HR クロアチア	MN モンゴル	UG ウガンダ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MR モルタリア	US 米国
CA カナダ	ID インドネシア	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MX メキシコ	VN ヴィニトナム
CG コンゴー	IL イスラエル	NE ニジェール	YU ユーゴースラビア
CH スイス	IS アイスランド	NL ノルダーランド	ZW ジンバブエ
CI コートジボアール	IT イタリア	NO ノルグニア	
CM カamerún	JP 日本	NZ ニュージーランド	
CN 中国	KE ケニア	PL ポーランド	
CU キューバ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CY キプロス	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
CZ チェコ	KR 韓国	RU ロシア	
DE ドイツ	KZ カザフスタン	SD スーダン	
DK デンマーク	LC セントルシア	SE スウェーデン	
EE ニストニア	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール	
ES スペイン	LK 斯リ・ランカ	SI スロヴェニア	

明細書

ヒト遺伝子

技術分野

本発明は、ヒトの疾患の予防、診断及び治療の指針として有用な遺伝子、より詳しくは、癌抑制遺伝子 p53 による特異的な転写制御下にあるヒト遺伝子に関するもので、遺伝子診断並びに新しい治療法の開発に利用可能な遺伝子に関する。

背景技術

癌抑制遺伝子 p53 の変異は、ヒト癌に見出される遺伝的変異において最も普遍的なものであり、ヒトの発癌に関与する最も重要な遺伝子のひとつとされている (Hollstein M., et al., Science (Washington DC), 253: 49-53, 1991)。

p53 は転写因子として作用し (Vogelstein B., et al., Cell, 70: 523-526, 1992)、配列特異的な DNAへの結合により、p21/WAF1、MDM2、GADD45、BAX、cyclin G、IGF-BP3、PCNA 及びGML等の各種遺伝子を活性化することが確認されている (El-Deiry W. S., et al., Cell, 75: 817-825, 1993; Wu X., et al., Genes Dev., 7: 1126-1132, 1993; Kastan M. B., et al., Cell, 71: 587-597, 1992; Miyashita T., et al., Cell, 80: 293-299, 1995; Okamoto K., et al., EMBO J., 13: 4816-4822, 1994; Buckbinder L., et al., Nature, 377: 646-649, 1995; Morris G. E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 895-899, 1996; Furuhata T., et al., Oncogene, 13: 1965-1970, 1996)。このうち、p21/WAF1、BAX 及びGMLは、p53 により介する細胞周期停止及びアポトーシスの主要因子と思われる。また、GADD45は、DNA修復に重要な役割を果たしている。

しかし、p53によって制御されている遺伝子の確認は、p53の生物生理学的機能の解明に必須である。すなわち、かかるp53標的遺伝子の同定、解明は、癌研究の分野はもとより、その標的遺伝子を利用する新しい癌の診断乃至治療法の開発の面からも斯界で望まれているところである。

尚、本発明者等は、ヒトゲノムの機能的p53結合部位(functional p53-binding sites或はp53タグサイト:p53-tagged sites)の近隣にp53標的遺伝子の候補を見出すようにデザインされた方法を確立しており、この方法に関して、本発明者はその発現が抗癌剤の感受性に相關すると考えられているGMLの単離に既に成功している(Furuhashi,T., et al., Oncogene, 13: 1965-1970, 1996)。

本発明は、癌抑制遺伝子p53の標的遺伝子(p53-target genes)或はp53誘導型遺伝子(p53-inducible genes)、すなわちp53による特異的な転写制御下にある新規なヒト遺伝子を見出し、これを同定して斯界で要望される所望の情報を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者等は、ヒトゲノムからの機能的p53タグサイトのクローニングにおいて、野生型p53によって誘導される新規な遺伝子を単離し、これが上記目的に合致する新規なヒト遺伝子であることを見出し、ここに本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、配列番号:1で示されるアミノ酸配列の全部又は一部をコードする塩基配列を含むヒト遺伝子、特に、配列番号:2で示される塩基配列の全部又は一部を含む遺伝子を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、野生型p53によるP2XM遺伝子発現の誘導を調べるために、野生

型 p 5 3 アレルを欠く大腸癌細胞株 SW 4 8 0 における p 5 3 誘導 mRNA の発現を RT - PCR により解析した結果を示す写真である。

図 2 は、ヒト組織における P 2 X M のノーザンプロット解析結果を示す写真である。

図 3 及び 4 は、 P 2 X M 遺伝子のゲノム構成を示す図であり、図 3 は 1 9 1 遺伝子のエクソン / イントロン境界のヌクレオチド配列を示し、図 4 の (b) はエクソン及び p 5 3 結合部位の存在位置を示し、図 4 の (c) はコスミド p 5 3 - 1 9 1 の p 5 3 結合部位と p 5 3 コンセンサス結合配列の比較を示す。

図 5 及び 6 は、各種 P 2 X レセプターのアミノ酸配列を示す図である。

図 7 は、別態様スプライシングバリエントを示す図である。

図 8 ~ 1 0 は、骨格筋及び各種癌細胞株におけるスプライシングバリエントの発現を RT - PCR により解析した結果を示す写真である。また、図 1 下は、蛍光 in situ バイオダイセクションの結果を示す写真である。

以下、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸等の略号による表示は、 I U P A C 、 I U B の規定、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁編) 及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

本発明遺伝子の一具体例としては、後述する実施例に示される「 P 2 X M 」と名付けられたクローシの有する DNA 配列から演繹されるものを挙げることができる。その塩基配列は、配列表に示される通りである。

本発明遺伝子は、例えば配列番号： 2 で示されるように、一本鎖 DNA 配列で表されるが、本発明はかかる一本鎖 DNA 配列に相補的な DNA 配列やこれらの両者を含むコンポーネントもまた包含する。尚、配列番号 2 に示す本発明遺伝子の配列は、これによりコードされる各アミノ酸残基を示すコドンの一つの組合

せ例であり、本発明遺伝子はこれに限らず、各アミノ酸残基に対して任意のコドンを組合せ選択した塩基配列を有することも勿論可能である。該コドンの選択は常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮することができる (Nucleic Acids Res., 9: 43-74, 1981)。

更に本発明遺伝子には、上記で示されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸乃至アミノ酸配列を置換、欠失、付加等により改変してなり、同様の機能を有する同効物をコードするDNA配列もまた包含される。これらポリペプチドの製造、改変(変異)等は天然に生じることもあり、また翻訳後の修飾により或は遺伝子工学的手法により、天然の遺伝子(例えば本発明の具体例遺伝子)を、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス (Methods in Enzymology, 154: p. 350, 367-382, 1987; 同 100: p. 468, 1983; Nucleic Acids Res., 12: p. 9441, 1984; 続生化学実験講座II「遺伝子研究法II」、日本化学会編, p. 105, 1986) 等の方法により改変したり、リソ酸トリエステル法やリソ酸アミダート法等の化学合成手段 (J. Am. Chem. Soc., 89: p. 4801, 1967; 同 91: p. 3350, 1969; Science, 150: p. 178, 1968; Tetrahedron Lett., 22: p. 1859, 1981; 同 24: p. 245, 1983) により変異させたDNAを合成したり、或はそれらの組合せにより取得することができる。

本発明にかかる配列番号: 2.に示す遺伝子は、p53による特異的な転写制御下にある遺伝子であり、生体においてp53によりその発現が活性化され、癌の抑制に寄与すると考えられる。従って、本発明遺伝子の発現を目的とする遺伝子治療或は本発明遺伝子産物の生体への投与は、癌の予防及び治療に極めて有用であると考えられる。殊に、遺伝性の高発癌体质であるLi-Fraumeni症候群や、p53遺伝子のLOHや、変異が認められる各種の癌等の場合のようにp53による癌抑制機能が失われた結果として癌化に向かうとされる個体において、本発明遺伝子乃至同遺伝子産物の利用が好適と考えられる。

尚、上記した本発明遺伝子を利用する遺伝子治療或は同遺伝子産物を利用する

癌処置においては、必ずしも本発明遺伝子又はそのコードする産物の全て、すなわち全配列からなる遺伝子或は産物が必要とされることはなく、本発明にかかる配列番号：2に示す遺伝子における所望の機能と実質的に同質な機能を保持する限りにおいて、前記したそれらの改変体或はそれらの一部配列からなる遺伝子或は産物が良好に使用できる。

本発明遺伝子を利用して、すなわち例えば、これを微生物のベクターに組込み、形質転換された微生物を培養することによって、上記各遺伝子でコードされるp-5-3関連蛋白を容易にかつ安定して製造することができる。また本発明の遺伝子を利用して得られる各蛋白を用いて、特異抗体を作成することができる。ここで抗原として用いられるコンポーネントとしては、上記遺伝子工学的手法に従って大量に產生される蛋白を用いることができ、得られる抗体はポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体のいずれでもよく、それぞれの蛋白の精製、測定、識別等に有利に利用できる。

本発明遺伝子は、本発明によって開示された配列情報に基づいて、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造できる。(Molecular Cloning, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); 統生化学実験講座「遺伝子研究法」、II、III)、日本生化学会編 (1986) 等参照)。

例えば、ヒトcDNAライブラリー(各遺伝子の発現される適当な起源細胞より常法に従い調製されたもの)から、本発明遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローンを選択することができる。(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6613, 1981; Science, 222, 778, 1983等)。

上記において、起源細胞としては、目的の遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞等が例示され、これらからの全RNAの分離、mRNAの分離や精製、cDNAへの変換(合成)、そのクローニング等はいずれも常法に従い実施できる。また、cDNAライブラリーは市販されてもおり、本発明においてはそれらcDNAライブラリー、例えばクローンテック社

(Clontech Lab. Inc.) 等より市販の各種cDNAライブラリー等を用いることもできる。

cDNAライブラリーからの本発明遺伝子のスクリーニングは、前記通常の方法に従い実施できる。該スクリーニング方法としては、例えばcDNAの產生する蛋白質に対して、該蛋白質特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより、対応するcDNAクローニングを選択する方法、目的のDNA配列に選択的に結合するプローブを用いたブラークハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等やこれらの組合せを例示できる。ここで用いられるプローブとしては、本発明遺伝子のDNA配列に関する情報をもとにして化学合成されたDNA配列等を用いるのが一般的であり、勿論既に取得された本発明遺伝子やその断片もかかるプローブとして利用できる。更に各細胞、組織より抽出、単離精製された天然抽出物の部分アミノ酸配列情報に基づき、センス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとして用いることができる。

また、本発明遺伝子の取得に際しては、PCR法(Science, 230: 1350-1354, 1985)によるDNA/RNA增幅法が好適に利用できる。殊に、ライブラリーから全長のcDNAが得られ難いような場合には、シース法(R.A.C.E.: Rapid amplification of cDNA ends; 実験医学, 12(6): 35-38, 1994)、殊に5'RACE(Froehman M. A. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8998-9002, 1988)の採用が好適である。かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、既に本発明によって明らかにされた本発明遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定でき、これは常法に従い合成できる。

尚、増幅させたDNA/RNA断片の単離精製は、前記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法等によればよい。

上記で得られる本発明遺伝子或は各種DNA断片等の塩基配列の決定も、常法に従うことができ、例えばジデオキシ法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74

: 5463-5467, 1977] やマキサムニギルバート法 [Method in Enzymology, 65: 499, 1980] 等により行なうことができる。かかる塩基配列の決定は、市販のシーケンスキット等を用いても容易に行ない得る。

本発明遺伝子の利用によれば、通常の遺伝子組換え技術（例えば、*Science*, 224: p. 1431, 1984; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 130: p. 692, 1985; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: p. 5990, 1983及び前記引用文献等参照）に従うことにより、各組換え体蛋白を得ることができる。該蛋白の製造は、より詳細には、本発明遺伝子が宿主細胞中で発現できる組換えD.N.Aを作成し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養することにより行なわれる。

ここで宿主細胞としては、真核生物及び原核生物のいずれも用いることができる。該真核生物の細胞には、脊椎動物、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞 (*Cell*, 23: 175-182, 1981) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞及びそのジヒドロ葉酸レダクター欠損株 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216-4220, 1980) 等がよく用いられているが、これらに限定される訳ではない。また、原核生物としては、大腸菌等の脊椎動物の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写終了配列等を保有するものを使用でき、これは更に必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、例えば、SV40の初期プロモーターを保有するpSV2dhfr (*Mol. Cell. Biol.*, 1: 854, 1981) 等を例示できる。また、真核微生物としては、酵母が一般によく用いられる中でもサッカロミセス属の酵母を有利に利用できる。該酵母等の真核微生物の発現ベクターとしては、例えば酸性ホスファターゼ遺伝子に対するプロモーターを有するpAM8-2 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 1-5, 1983) 等を利用できる。また、本発明遺伝子の発現ベクターとしては、原核生物遺伝子融合ベクターを好ましく例示でき、該ベクターの具体例としては、例えば分子量26000のGSTドメイン (S.

japonicum 由来) を有する p GEX - 2 TK や p GEX - 4 T - 2 等を例示できる。

原核生物の宿主としては、大腸菌や枯草菌が一般によく用いられる。これらを宿主とする場合、例えば該宿主菌中で複製可能なプラスミドベクターを用い、このベクター中に本発明遺伝子が発現できるように該遺伝子の上流にプロモーター及びSD (シャイン・アンド・ダルガーノ) 塩基配列、更に蛋白合成開始に必要な開始コドン (例えばATG) を付与した発現プラスミドを利用するのが好ましい。上記宿主としての大腸菌としては、エシエリヒア・コリ (Escherichia coli) EK 1-2 株等がよく用いられ、ベクターとしては一般に pBR322 及びその改良ベクターがよく用いられるが、これらに限定されず公知の各種の菌株及びベクターを利用できる。プロモーターとしては、例えばトリプトファン (trp) プロモーター、lpp プロモーター、lacZ プロモーター、SP1/PR プロモーター等を使用できる。また、本発明の組換え DNA の導入方法及びこれによる形質転換方法としては、一般的な各種方法を採用できる。また得られる形質転換体は、常法に従い培養でき、該培養により本発明遺伝子によりコードされる目的の蛋白が生産、発現される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、その培養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

上記により、形質転換体の細胞内、細胞外乃至細胞膜上に目的とする組換え蛋白が発現、生産、蓄積乃至分泌される。

各組換え蛋白は、所望により、その物理的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作 (〔「生化学データーブックII」、1175-1259 頁、第1版第1刷、1980 年 6月23日株式会社東京化学同人発行; Biochemistry, 25(25): 8274-8277, 1986; Eur. J. Biochem., 163: 313-321, 1987 等参照〕) により分離、精製できる。該方法としては、具体的には例えば通常の再構成処理、蛋白沈殿剤による処

理（塩析法）、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、及びこれらの組合せ等を例示でき、特に好ましい上記方法としては所望の蛋白を結合させたカラムを利用したアフィニティクロマトグラフィーを例示できる。

また、本発明によって明らかにされた本発明遺伝子の配列情報を基にすれば、例えば該遺伝子の一部又は全部の塩基配列を利用することにより、各種ヒト組織における本発明遺伝子の発現の検出を行なうことができる。これは常法に従って、例えばRT-PCR (Reverse transcribed-Polymerase chain reaction; Kawasaki E. S. et al., "Amplification of RNA." In PCR Protocol-A Guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, 21-27, 1991)

によるRNA增幅により、またノーザンブロッティング解析 (Molecular Cloning, Cold Spring-Harbor Laboratory, 1989) 等により、いずれも良好に実施し得る。

尚、前記PCR法を採用する場合において、用いられるプライマーは、本発明遺伝子のみを特異的に増幅できる本発明遺伝子に特有のものである限り何等限定ではなく、本発明遺伝情報に基いてその配列を適宜設定することができる。通常これは常法に従って2.0～3.0ヌクレオチド程度の部分配列を有するものとすることができる。

しかし、本発明はかかる新規なヒト遺伝子に特有の検出に有用なプライマー及び／又はプローブをも提供するものである。

実施例

以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げる。

実施例1

(1) コスミドライブラーのスクリーニング

p5'3タグサイト(クローンP5'3-191)は、時野等の方法に従い特定した(Tokino T., et al., *Hum. Mol. Gene.*, 3: 1537-1542, 1994)。p5'3タグサイトを含む(³²P)標識プローブを使用して、ヒト末梢血リンパ球のコスミドライブラーをスクリーニングした。得られたコスミド:p5'3-cos191をEcoRIで消化し、該EcoRIフラグメントをpBluescript II SK (-) (Stratagene)にサブクローン化した。

DNA配列決定は、キット(Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit; ABI)を使用してABI 377 DNAシークエンサーにて行った。

(2) cDNAクローニング
コスミドp5'3-cos191に存在する遺伝子の単離に、エクソン増幅とRACEの両者を行った。
コスミドp5'3-cos191をBamHI及びBglIIにて消化し、該制限酵素フラグメントを、エクソントラップベクターpSP_EL3 (Gibco-BRL)のBamHIサイトにサブクローン化し、Lipofect ACE (Gibco-BRL)を用いてCOS7細胞に導入した。該細胞を2-4時間培養後、TRIZOL (Gibco-BRL)により全RNAを調製した。ファーストストランドcDNA合成及びスプライスしたフラグメントのPCR増幅は、North等の方法に従い実施した(North M. A., et al., *Mamm. Genome*, 4: 466-474, 1993)。cDNAフラグメントは、pBluescript II SK (-)にサブクローン化され、上記のとおりT3又はT7プライマーを使用して配列決定された。候補のひとつとしての配列191E1を、cDNA増幅キット(Marathon cDNA amplification kit; Clontech)を用い、骨格筋ボリ(A)+RNAを錆型として使用する5'-及び3'-RACEに付した。

(3) RT-PCR解析

p5'3発現ベクター、p5'3-wt又はp5'3-273 (Kern S. E., et al.,

Science (Washington DC), 256: 827-830, 1992]、による大腸癌細胞株 SW480の一過的DNA導入及びcDNAの調製は、Furuhashi 等の報告に従い行った [Furuhashi T., et al., Oncogene, 13: 1965-1970, 1996]。全RNAは、Superscript II (Gibco-BRL) を使用して逆転写した。RT-PCRの指數的成長相は、20-30サイクルにおいて決定され、同一反応により得られたcDNA間の半定量的比較を可能とした。各PCR反応は、200ngの全RNAからのcDNAを使用して実施した。PCR溶液は文献 [Han H-J., et al., Hum. Mol. Genet., 4: 237-242, 1995] 記載のものを用いし、反応は、94°C 2分の初期変性ステップに次ぐ3.0サイクル (191E1の場合) 又は2.5サイクル (p21/WAF1及びGAPDHの場合) のサイクリングステップ (94°C 3.0秒、55-60°C 3.0秒、72°C 1分) にて行った (GeneAmp PCR system 9600; PerkinElmer)。プライマー配列は、次表1のとおりである。

表1 プライマー配列

プライマー	塩基配列
(191E1)	
E1S2	5' - AGCCACTCACTGGTGGGA - 3'
E1A2	5' - CCCGGTGACGAGGATGTCGA - 3'
(p21/WAF1)	
W1S	5' - GTTCCCTTGTGGAGCCGGAGC - 3'
W2A	5' - GGTACAAGACAGTACAGGTC - 3'
(GAPDH)	
HGS	5' - CAACTACATGGTTACATGTT - 3'
HGA	5' - GCCAGTGGACTCCACGAC - 3'

增幅されたcDNAは、3%Nu-Sieve GTG (2:1) アガロースゲル

にて分離した。

(4) ノーザンプロット解析

正常ヒト組織由来のポリ(A) + RNAを含むノーザンプロット(Clontech)を本発明cDNAのヌクレオチド909-1583に相当するランダムプライム [³²P] 標識DNAプローブによりハイブリダイズした。プロットを50°Cにて洗浄し(0.1×SSC/0.1% SDS) -80°Cにて24時間オートラジオグラフィーの感光に付した。

(5) FISH

FISHは、Inazawa等の方法に従い実施した(Inazawa J., et al., Genomics, 17: 153-162, 1993)。ヒト分裂中期染色体は、常法(thymidine synchronization / bromodeoxyuridine release technique)に従い調製した。ハイブリダイゼーションに先立ち、分裂中期の細胞は染色(Hoechst 33258)及びUV照射した。コスミドクローンp53-cos191は、ニックトランスクレーションによりビオチン-16-dUTPにより標識し、変性した分裂中期染色体とハイブリダイズした。A-Tリピートのような散在する繰返し配列によるノイズシグナルを除去する為に、染色体 *in situ* 抑制(chromosomal *in situ* suppression)ハイブリダイゼーションを使用した。ハイブリダイズシグナルは、FITC-アビシンにて検出した。ハイブリダイズシグナルの詳細な位置決定は、複製-Gバンドの可視化によって行った。

(6) 相同性検索

DNA比較は、FASTAプログラムによるデータベース検索により行った(non-redundant nucleic acid sequence database又はnon-redundant protein sequence database; ヒトゲノム解析センター、東京大学医科学研究所)。

(7) 結果

(イ) p53誘導遺伝子のクローニング

p53タグサイトのひとつ、クローンP53-191をプローブとして、ヒト

ゲノムコスミドライブラーをスクリーニングし、コスミドクローン：p 5 3 - cos 1 9 1を得た。このコスミドに由来する配列がp 5 3による転写制御を受けているかどうかを調べる為に、RT - PCR解析を行った。RT - PCRでは、野生型又は変異型p 5 3 c DNAを含む発現ベクターで一過的にDNA導入したSW 4 8 0細胞(SW 4 8 0 - wt 5 3又はSW 4 8 0 - mt 5 3)より調製したRNAを錆型として使用した。候補配列のひとつである1 9 1 E 1を試験した結果、SW 4 8 0 - mt 5 3(変異型)における場合に比べて、SW 4 8 0 - wt 5 3(野生型)における発現が著しく増加しており(図1参照)、1 9 1 E 1の発現は野生型p 5 3によって誘導されていると考えられた。

尚、図1は、野生型p 5 3アレルを欠く大腸癌細胞株SW 4 8 0におけるp 5 3誘導m RNAの発現をRT - PCRにより解析した結果を示す写真である。これによれば、SW 4 8 0を、p 5 3 - wt (W)又はp 5 3 - 2 7 3 (M)等で一過的逆形質転換して、RT - PCR增幅によりP2XM遺伝子の発現を確認した。RNAサンプルは、逆転写酵素(RT)存在下(+)又は非存在下(-)に逆転写反応に供した。RNA錆型はGAPDH転写物の増幅によりコントロールし、「これは両サンプルにおいて同程度のシグナルを与えた。」

次いで、1 9 1 E 1をプローブとして使用したc DNAスクリーニング並びに5' - 及び3' - RACEを行ない、3 5 5 - 2 bpからなるc DNAを単離した。「P2XM」と名付けられた該c DNAは、4 3 1 - アミノ酸の蛋白をコードする1 2 9 3 bpのオープンリーディングフレームを有している。その全DNA配列は、配列番号：3に示すとおりである。即ち、P2XM c DNAのコード領域は、塩基番号4 6から1 3 3 8に示され、潜在的なトランスマンブルードメイン(M 1及びM 2)は、それぞれアミノ酸番号で3 3～4 9番目及び3 2 4～3 4 4番目のアミノ酸配列にあり、またvoltage-gated K⁺ channels H 5領域の類似セグメント(H)は、アミノ酸番号3 0 6～3 1 9に存在していた。

該c DNAをプローブとするノーザンプロット解析によれば、骨格筋において

3. 6 kb の転写物が検出されており(図2参照)、従って、該cDNAは、ほぼ完全な転写物を含んでいるものと考えられる。

尚、図2はヒト組織におけるP2XMのノーザンプロット解析結果を示す写真であり、各種組織(Heart, Brain, Placenta, Lung, Skeletal muscle, Kidney, Spleen, Thymus, Prostate, Testis, Ovary, Small intestine, Colon, Leukocyte)からのポリ(A)⁺RNA(2 μg/レーン)のプロットをP2XM cDNAとハイブリダイズさせた結果を示すものである。

(ロ) 相同性検索

蛋白データベースの相同性検索によれば、本発明にかかるアミノ酸配列は、ATP-gated ion channel(P2X)レセプターファミリー[Valera S., et al., Nature, 371: 516-519, 1994; Brake A. J., et al., Nature, 371: 519-523, 1994]と類似性を有し、特にラットP2X6[Collo G., et al., J. Neurosci., 16: 2495-2507 1996]と80%の同一性を示した(図5及び6参照)。

図3及び4は、P2XM遺伝子のゲノム構成を示す図であり、図3(a)は、1-9-1遺伝子のエクソン/イントロン境界のヌクレオチド配列を示している。エクソン及びイントロンの配列は、順次、大文字及び小文字で示されている。図4中、(b)は、エクソンの存在位置を、そのサイズに応じた、番号付き箱により示したものである。また、図4中(c)は、コスマドp53-1-9-1のp53結合部位とp53コンセンサス結合配列を比較したものであり、矢印は、p53コンセンサス結合配列(ペントマー)を示す。大文字のヌクレオチドは、コンセンサスに一致するゲノム配列を示し、小文字はコンセンサス配列と相違する配列を示している。P2Xレセプター(P2X1-X6)ファミリーの全てのメンバーは、2つのトランスメンブラン領域(M1及びM2)、voltage-gated K⁺channelのH5領域に類似しているセグメント(H5)、N-ケリコシレーションサイト及び進化上保存されている11システイン残基を有している(図5及び6参照)。

図5及び6は、各種P₂Xレセプターのアミノ酸配列を示すものであり、図中、箱囲みした残基は、P₂X Mの配列及びラットP₂X₁ - P₂X₇レセプターに共通して保存されている。上線は、保存されている2つの疎水性領域(M₁及びM₂)及びH₅を示す。星印は、P₂X Mの潜在的N-結合グリコシレーションサイトを示す。

本発明のかかる遺伝子によってコードされているアミノ酸配列は、同様にこれらP₂Xレセプターファミリーの基本的特徴を有しており、これはヒトP₂Xレセプターファミリーの新規なメンバーであると考えられる。

(ハ) 構造解析

上記cDNAとその対応するゲノムDNA配列(p53-cos191)の比較により、エクソン/イントロン境界及び近接イントロンの近傍DNA配列を含む、この遺伝子のゲノム構成が明らかとなった(図3参照)。この遺伝子は、約1.2 kbのゲノム領域におよんでおり、第2のエクソンからなる(図4のb参照)。p53タグサイトは、この遺伝子の約1.6 kb下流に存在している(図4のb及びc参照)。コスミドp53-cos191をプローブとする蛍光in situハイブリダイゼーション法(FISH法)により、この遺伝子の染色体位置は、22q11と確認された(図11参照:特異的なハイブリダイゼーションシグナルがヒト染色体バンド22q11に認められ、他の染色体上にはシグナルは認められなかった)。

(二) 骨格筋(Skeletal muscle)における別態様スプライシング(alternative splicing)

骨格筋より調製したRNAのRT-PCR後の直接DNA配列決定では、エクソン1.0、エクソン1.0-1.1又はエクソン1の一部(エクソン1のドナーサイトから下流18 bp)を欠く、別態様スプライシングの3種のインフレーム転写物(AL1、L2及びAL3)が確認された(図7参照)。

この別態様スプライシングの模式図を図7に示す。正常骨格筋からの主要な

RT-PCR増幅産物は、N1とN2で示されている。3つのタイプのバリアントは、AL1、AL2及びAL3で示されている。

これら別態様スプライシング転写物のそれぞれは、3の倍数のヌクレオチドを欠失しており、いずれもそのリーディングフレームは維持されていた。

図3及び4に示すように、エクソン1-2及びエクソン11は、順次、トランスマンプラン領域M1及びM2に相当する。該M1及びM2領域は、エクソン10によってコードされる近接疎水性セグメント(H5)とともに、ion pore and ion-binding サイトを形成するとされている。(Valera S., et al., *Nature*, 371: 516-519, 1994; Brake A. J., et al., *Nature*, 371: 519-523, 1994)。

構造的推定によれば、これらのエクソンは、生物学的機能に重要なドメインをコードしているものと思われる。

(ホ)ヒト癌細胞株における発現と別態様スプライシング
 近年、異常な別態様スプライシングがヒト癌の発生、進展及び又は転移に何等かの関与をなしていることが報告されている。(Gunther U., et al., *Cell*, 65: 13-24, 1991; Arch R., et al., *Science (Washington DC)*, 257: 682-685, 1992)。そこで、4種の横紋筋肉腫、2種の骨肉腫及び1種の脂肪肉腫に由来する細胞株で、本発明遺伝子のmRNAレベル及び別態様スプライシングをRT-PCR解析により評価した。結果を図8~10に示す。同図において、RT-PCRは、細胞株から調製した全RNA(200ng)を用いて前記に従い実施したものであり、各レーン(Cell lines)は、横紋筋肉腫(A204: レーン1, A673: レーン2, Hs729T: レーン3, RD: レーン4), 脂肪肉腫(SW872: レーン5)及び骨肉腫(NY: レーン6, Hu03N1: レーン7)におけるものである。また、骨格筋の全RNA(200ng)から調製し希釈(1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32)したcDNAを用いてPCR増幅した結果を併せて示している("Skeletal muscle" レーン)。

図8及び9は、前記のN1、AL1、N2、AL2及びAL3における結果を

示すものであり、それらのPCR産物サイズは、順次、392、314、450、384及び306 bpである。尚、RNA鑄型は、GAPDHの増幅をとおしてコントロールし、これは全てのサンプルにおいて同様のシグナルを与えた（図10）。

その結果、この遺伝子の発現は、試験した7種の細胞株中、ひとつの横紋筋肉種細胞株（A673）において顕著に減少していた。また、これら細胞株における別々のスプライシングは、次のとおりであった。エクソン10及びエクソン10-11を欠くスプライスバリアントは、癌細胞におけるその転写パターンが、正常な骨格筋でのそれに類似していた。一方、エクソン11の一部を欠失しているバリエントの割合は、正常骨格筋では少なかったのに対し、ひとつの横紋筋肉種細胞株（RD）及びひとつの骨肉腫（Hu03N1）では相対的により多く認められた。

（ヘ）考察

本発明によりATP-gated ion channelsを司るP2Xファミリーの新規なメンバーであると考えられる新規なp5'3'-誘導型遺伝子が単離された。p5'3'結合性配列は、この遺伝子を含む全コスミドDNAの配列決定により、該遺伝子の下流約1.6 kbに見出された。p5'3'により制御されている遺伝子の機能的p5'3'結合部位は、今まで、これら遺伝子のイントロン又はプロモーター領域中に見出されてきている。本発明の新規遺伝子においては、該機能的p5'3'結合部位は、その下流に位置していた。これらの結果は、p5'3'結合部位がエンハンサー配列として働く可能性を示唆している。

本発明cDNAから推定されるアミノ酸配列は、P2Xレセプターファミリーのメンバー、特にラットP2X6（80%同一性）、に相同意を有する。しかししながら、ラットP2X6 mRNAが脳の広い範囲において見出されるのに対し、この遺伝子は骨格筋において特異的に発現されており、従って、これがラットP2X6のヒト相同物であるとは考えられない。P2Xレセプターは、ATP-gated ion channelsに分類され、細胞死やシナプス伝達のような細胞外ATP

誘導型生物活性のメディエーターとして機能するとされてきている (Zheng L.M., et al., *J. Cell Biol.*, 113: 279-288 1991); Zoetewij J.P., et al., *Biochem. J.*, 288: 207-213, 1992; Kennedy C., et al., *Nature*, 377: 385-386, 1995)。また、アミノ酸レベルでの配列類似性は、RP-2と呼ばれる部分配列 cDNAとの間でも認められる。RP-2は、ガンマ照射によりアボートーシスを起こしているラット胸腺細胞において誘導されるmRNAからの subtractive バイブリダイゼーションによって単離されている (Owens G.W.P., et al., *Mol. Cell. Biol.*, 11: 4177-4188 1991)。ATPは、細胞内カルシウム濃度を増加することにより、胸腺細胞、肝細胞及び各種のリンパ球細胞株において細胞死を誘導する。これらの事実によれば、本発明遺伝子は、骨格筋における p¹⁵/3 依存性アボトーシス (おそらく細胞外 ATPにより仲介される) に密接に関与しているものと考えられる。

発明 (八)

また、ソーザンプローフ解析により、骨格筋において約 6 kb 転写物が検出された。この遺伝子の発現は、4種の横紋筋肉種細胞株のひとつにおいて著しく減少していた。加えて、主にテンスメンブランドメインM15の一部をコードするエクソン 1 の一部を欠失するマイナーなスプライスバリアントが、残り 6 種の癌細胞株の内 2 つにおいて相対的に多く認められた。試験した癌細胞株で別態様スプライシングで生じる異常産物の割合が高かったことは注目され、アミノ末端での不均一性の生物学的意義を明らかにする事が重要となる。更に、横紋筋肉種を含む種々の組織の癌では、この遺伝子を含む染色体領域 (22q11) に欠失があることが報告されており (Newsham H., et al., *Genomics*, 19: 433-440, 1994; Schofield D. E., et al., *Genes Chromosom. Cancer*, 15: 10-17, 1996; Biegel J. A., et al., *Genes Chromosom. Cancer*, 16: 94-105, 1996)、この遺伝子がこの領域に存在する癌抑制遺伝子である可能性を示唆している。

以上のように、本発明の遺伝子が、多くの組成物の構成要素となり得ること、産業上の利用可能性があり、また、その有用性が示された。

ヒトゲノムからの機能的 p 5.3 タグサイトのクローニングにおいて、野生型 p 5.3 によって誘導される新規な遺伝子を単離した。この c-DNA 配列は、P 2 X レセプターファミリーに相同意を示す 431 アミノ酸ペプチドをコードするオーブンリーディングフレームを含んでいる。このペプチドは、P 2 X ファミリーのメンバーの主要な特徴を有し (ATP-gated ion channels)、また、プログラム細胞死 (programmed cell death) を誘導された胸腺細胞において活性化される遺伝子、RP-2、と類似する。この遺伝子は、主に骨格筋に発現され、P 2 XM (P2X specifically expressed in skeletal muscle) と名付けられた。該 P 2 XM 遺伝子は、細胞増殖の抑制及び／又は骨格筋におけるアポトーシスに関与すると思われる。

この遺伝子の発現は、試験した 4 種の横紋筋肉種細胞株のひとつにおいて著しく抑制されていた。トランスマンプラン領域 M1 をコードするエクソン 1 の一部を欠くマイナーなスプライスバリエントが、試験した 7 種の癌細胞株の 2 つにおいて相対的に多かった。このことは、このスプライシングによって生じる変異産物の比率が、これらの癌細胞株において著しく増加することを示唆する。この遺伝子は、杆状癌 (rhabdoid tumor) において欠失が知られている染色体バンド 22q11 に位置していた。

本発明によれば、癌抑制遺伝子 p 5.3 による特異的な転写制御下にある新規なヒト遺伝子が提供され、該遺伝子を用いれば、該遺伝子の各種組織での発現の検出や、そのコードする産物の構造及び機能等を解析でき、また、該遺伝子産物の遺伝子工学的製造が可能となり、これらにより、癌の発生、進展、転移等の解明やその診断、予防、治療等に有用な技術が提供される。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：431

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：蛋白質

配列

Met Gly Ser Pro Gly Ala Thr Thr Gly Trp Gly Leu Leu Asp Tyr Lys
 1 5 10 15

Thr Glu Lys Tyr Val Met Thr Arg Asn Trp Arg Val Gly Ala Leu Gln
 20 25 30

Arg Leu Leu Gln Phe Gly Ile Val Val Tyr Val Val Gly Trp Ala Leu
 35 40 45

Leu Ala Lys Lys Gly Tyr Gln Glu Arg Asp Leu Glu Pro Gln Phe Ser
 50 55 60

Ile Ile Thr Lys Leu Lys Gly Val Ser Val Thr Gln Ile Lys Glu Leu
 65 70 75 80

Gly Asn Arg Leu Trp Asp Val Ala Asp Phe Val Lys Pro Pro Gln Gly
 85 90 95

Glu Asn Val Phe Leu Val Thr Asn Phe Leu Val Thr Pro Ala Gln
 100 105 110

Val Gln Gly Arg Cys Pro Glu His Pro Ser Val Pro Leu Ala Asn Cys
 115 120 125

Trp Val Asp Glu Asp Cys Pro Glu Gly Glu Gly Thr His Ser His
 130 135 140

Gly Val Lys Thr Gly Gln Cys Val Val Phe Asn Gly Thr His Arg Thr

145 150 155 160
 Cys Glu Ile Trp Ser Trp Cys Pro Val Glu Ser Gly Val Val Pro Ser
 165 170 175
 Arg Pro Leu Leu Ala Gln Ala Gln Asn Phe Thr Leu Phe Ile Lys Asn
 180 185 190
 Thr Val Thr Phe Ser Lys Phe Asn Phe Ser Lys Ser Asn Ala Leu Glu
 195 200 205
 Thr Trp Asp Pro Thr Tyr Phe Lys His Cys Arg Tyr Glu Pro Gln Phe
 210 215 220
 Ser Pro Tyr Cys Pro Val Phe Arg Ile Gly Asp Leu Val Ala Lys Ala
 225 230 235 240
 Gly Gly Thr Phe Glu Asp Leu Ala Leu Leu Gly Gly Ser Val Gly Ile
 245 250 255
 Arg Val His Trp Asp Cys Asp Leu Asp Thr Gly Asp Ser Gly Cys Trp
 260 265 270
 Pro His Tyr Ser Phe Gln Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Asn Phe Arg Thr
 275 280 285
 Ala Thr His Trp Trp Glu Gln Pro Gly Val Glu Ala Arg Thr Leu Leu
 290 295 300
 Lys Leu Tyr Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu Val Thr Gly Gln Ala Gly
 305 310 315 320
 Lys Phe Gly Leu Ile Pro Thr Ala Val Thr Leu Gly Thr Gly Ala Ala
 325 330 335
 Trp Leu Gly Val Val Thr Phe Phe Cys Asp Leu Leu Leu Tyr Val
 340 345 350
 Asp Arg Glu Ala His Phe Tyr Trp Arg Thr Lys Tyr Glu Glu Ala Lys

355	360	365
Ala Pro Lys Ala Thr Ala Asn Ser Val Trp Arg Glu Leu Ala Leu Ala		
370	375	380
Ser Gln Ala Arg Leu Ala Glu Cys Leu Arg Arg Ser Ser Ala Pro Ala		
385	390	395
Pro Thr Ala Thr Ala Ala Gly Ser Gln Thr Gln Thr Pro Gly Trp Pro		
405	410	415
Cys Pro Ser Ser Asp Thr His Leu Pro Thr His Ser Gly Ser Leu		

	420	425	430
配列番号	2	2	2
配列の長さ	1293	85	55
配列の型	核酸	核酸	核酸
鎖の数	一本鎖	一本鎖	一本鎖
トポロジー	直線状	直線状	直線状
配列の種類	DNA (cDNA)		
配列			
ATGGGCTCCC CAGGGGCTAC GACAGGCTGG GGGCTTCTGG ATTATAAGAC CGAGAAGTAT	60		
GTGATCACCA CGAACCTGGCG GGTGGGCCCG CCAGAGGC TGCTCCAGTT TGGGATCGTG	120		
GTCTATGTGG TAGGGTGGCG GCTCCTCGCC AAAAAAGGCT ACCAGGAGCG GGACCTGGAA	180		
CCCCAGTTT CCATCATCAC CAAACTCAAA GGGGTTCCG TCACTCAGAT CAAGGAGCTT	240		
GGAAACCCGGC TGTGGGATGT GGCCTGACTTC GTGAAGCCAC CTCAGGGAGA GAACGTGTC	300		
TTCTTGGTGA CCAACTTCCT TGTGACGCCA CCCCAAGTTC AGGGCAGATG CCCAGAGCAC	360		
CCGTCCGTCC CACTGGCTAA CTGCTGGGTC GACGAGGACT GCCCCGAACG GGAGGGAGGC	420		
ACACACAGCC ACGGTGTAAA AACAGGCCAG TGTGTGGTGT TCAATGGGAC CCACAGGACC	480		
TGTGAGATCT GGAGTTGGTG CCCCGTGGAG AGTGGCGTTG TGCCCTCGAG GCCCCCTGCTG	540		
CCCCAGGGCCC AGAACATTCACT ACTGTTCATC AAAAACACAG TCACCTTCAG CAAGTTCAAC	600		

TTCTCTAACT CCAATGCCCTT GGAGACCTGG GACCCCACCT ATTTAAGCA CTGCCGCTAT 660
 GAACCACAAT TCAGCCCCTA CTGTCCCCGTG TTCCGCATTG GGGACCTCGT GGCCAAGGCT 720
 GGACGGACCT TCGAGGACCT GGCGTTGCTG CGTGGCTCTG TAGGCATCAG AGTTCACTGG 780
 GATTGTGACC TGGACACCGG GGAACCTCGC TCCTGGCCTC ACTACTCCTT CCAGCTCCAG 840
 GAGAAGAGCT ACAACTTCAG GACAGCCACT CACTGGTGGG AGCAACCGGG TCTGGAGGCC 900
 CCCACCCCTGC TCAAGCTCTA TCCAATCCGC TTCGACATCC TCGTCACCCGG GCAGGCAGGG 960
 AAGTTCGGGC TCATCCCCAC GCCCCGTACACA CTGGGCACCG GGGCAGCTTG CCTGGCCCTG 1020
 GTCACCTTTT TCTGTGACCT GCTACTGCTG TATGTGGATA GAGAAGCCCA TTTCTACTGG 1080
 AGGACAAAGT ATGAGGAGGC CAAGGCCCCG AAAGCAACCG CCAACTCTGT GTGGAGGGAG 1140
 CTGGCCCTTG CATCCCAAGC CCCACTGGCC GACTGCCCTCA GACGGAGCTC AGCACCTGCA 1200
 CCCACGGCCA CTGCTGCTGG GAGTCAGACA CAGACACCAG GATGGCCCTG TCCAAGTTCT 1260
 GACACCCACT TGCCAAACCCCA TTCCGGGAGC CTG 1293

配列番号 : 3460170

配列の長さ : 1697

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直線状

配列の種類 : DNA (cDNA)

配列の特徴 : CDS (Coding Sequence) と呼ばれる領域

特徴を表わす記号 : CDS

存在位置 : 46..1338

特徴を決定した方法 : E. coli K-12 MG1655

配列 :

CTGCCATGCT GACTCATGTG CCCGCAGCTA GCAGGAGCTG GCAGC ATG GGC TCC 54

Met Gly Ser

CCA GGG GCT ACG ACA GGC TGG GGG CTT CTG GAT TAT AAG ACG GAG AAG 102
 Pro Gly Ala Thr Thr Gly Trp Gly Leu Leu Asp Tyr Lys Thr Glu Lys
 5 .
 10 .
 15 .
 TAT GTG ATG ACC AGG AAC TGG CGG GTG GGC GCC CTG CAG AGG CTG CTG 150
 Tyr Val Met Thr Arg Asn Trp Arg Val Gly Ala Leu Gln Arg Leu Leu
 20 .
 25 .
 30 .
 35 .
 CAG TTT GGG ATC GTG GTC TAT GTG GTA GGG TGG GCG CTC CTC GCC AAA 198
 Gln Phe Gly Ile Val Val Tyr Val Val Gly Trp Ala Leu Leu Ala Lys
 40 .
 45 .
 AAA GGC TAC CAG GAG CGG GAC CTG GAA CCC CAG TTT TCC ATC ATC ACC 246
 Lys Gln Tyr Gln Glu Arg Asp Leu Glu Pro Gln Phe Ser Ile Ile Thr
 50 .
 55 .
 60 .
 65 .
 AAA CTC AAA GGG GTT TCC GTC ACT CAG ATC AAG GAG CTT GGA AAC CGG 294
 Lys Leu Lys Gly Val Ser Val Thr Gln Ile Lys Glu Leu Gly Asn Arg
 70 .
 75 .
 80 .
 CTG TGG GAT GTG GCC GAC TTC GTG AAG CCA CCT CAG GGA CAG AAC GTC 342
 Leu Trp Asp Val Ala Asp Phe Val Lys Pro Pro Gln Gly Glu Asn Val
 85 .
 90 .
 95 .
 TTC TTC TTG GTG ACC AAC TTC CTT GTG ACG CCA CCT CAG GGA CAG GGC 390
 Phe Phe Leu Val Thr Asn Phe Leu Val Thr Pro Ala Gln Val Gln Gly
 100 .
 105 .
 110 .
 115 .
 AGA TCC CCA GAG CAC CCC TCC GTC CCA CTG GCT AAC TGC TGG GTC GAC 438
 Arg Cys Pro Glu His Pro Ser Val Pro Leu Ala Asn Cys Trp Val Asp
 120 .
 125 .
 130 .
 GAG GAC TGC CCC GAA GGG GAG GGA GGC ACA CAC AGC CAC GGT GTA AAA 486
 Glu Asp Cys Pro Glu Gly Glu Gly Thr His Ser His Gly Val Lys

135	140	145	
ACA GGC CAG TGT GTG GTG TTC AAT GGG ACC CAC AGG ACC TGT GAG ATC			534
Thr Gly Gln Cys Val Val Phe Asn Gly Thr His Arg Thr Cys Glu Ile			
150	155	160	
TGG AGT TGG TCC CCC GTG GAG AGT GCC GTT GTG CCC TCG AGG CCC CTG			582
Trp Ser Trp Cys Pro Val Glu Ser Gly Val Val Pro Ser Arg Pro Leu			
165	170	175	
CTG GCC CAG CCC CAG AAC TTC ACA CTG TTC ATC AAA AAC ACA GTC ACC			630
Leu Ala Gln Ala Gln Asn Phe Thr Leu Phe Ile Lys Asn Thr Val Thr			
180	185	190	195
TTC AGC AAG TTC AAC TTCTCT AAG TCC AAT GCGTTG GAG ACC TGG GAC			678
Phe Ser Lys Phe Asn Phe Ser Lys Ser Asn Ala Leu Glu Thr Trp Asp			
Gly Gln Asn 200 Asn Val Val 205 Asn Val Asn 210 Asn Val 215 Asn			
CCC ACC TAT TTT AAG CAC TGC CCC TAT GAA CCA CAA TTC ACC CCC TAC			726
Pro Thr Tyr Phe Lys His Cys Arg Tyr Glu Pro Gln Phe Ser Pro Tyr			
215	220	225	
TGT CCC GTG TTC CGC ATT GGG GAC CTC GTG GCC AAG GCT GGA GGG ACC			774
Cys Pro Val Phe Arg Ile Gly Asp Leu Val Ala Lys Ala Gly Gly Thr			
230	235	240	
TTC GAG GAC CTG CGC TTG CTC CGT CGC TCT GTC GGC ATC AGA GTT CAC			822
Phe Glu Asp Leu Ala Leu Leu Gly Gly Ser Val Gly Ile Arg Val His			
245	250	255	
TGG GAT TGT GAC CTG GAC ACC GGG GAC TCT GGC TGC TGG CCT CAC TAC			870
Trp Asp Cys Asp Leu Asp Thr Gly Asp Ser Gly Cys Trp Pro His Tyr			
260	265	270	275
TCC TTC CAG CTG CAG GAG AAC AGC TAC AAC TTC AGG ACA CCC ACT CAC			918

Ser Phe Gln Leu Gln Glu Lys Ser Tyr Asn Phe Arg Thr Ala Thr His
 280 285 290
 TGG TCG GAG CAA CCG GGT GTG GAG GCC CGC ACC CTG CTC AAG CTC TAT 966
 Trp Trp Glu Gln Pro Gly Val Glu Ala Arg Thr Leu Leu Lys Leu Tyr
 295 300 305
 GGA ATC CGC TTC GAC ATC CTC GTC ACC GGG CAG GCA GGG AAG TTC GGG 1014
 Gly Ile Arg Phe Asp Ile Leu Val Thr Gly Gln Ala Gly Lys Phe Gly
 310 315 320
 CTC ATC CCC ACG CCC CTC ACA CTG GGC ACC GGG GCA GCT TGG CTG GGC 1062
 Leu Ile Pro Thr Ala Val Thr Leu Gly Thr Gly Ala Ala Trp Leu Gly
 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415
 CTG GTC ACC TTT TTC TGT GAC CTG CTA CTG CTG TAT GTG GAT AGA GAA 1110
 Val Val Thr Phe Phe Cys Asp Leu Leu Leu Tyr Val Asp Arg Glu
 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 10495 10500 10505 10510 10515 10520 10525 10530 10535 10540 10545 10550 10555 10560 10565 10570 10575 10580 10585 10590 10595 10600 10605 10610 10615 10620 10625 10630 10635 10640 10645 10650 10655 10660 10665 10670 10675 10680 10685 10690 10695 10700 10705 10710 10715 10720 10725 10730 10735 10740 10745 10750 10755 10760 10765 10770 10775 10780 10785 10790 10795 10800 10805 10810 10815 10820 10825 10830 10835 10840 10845 10850 10855 10860 10865 10870 10875 10880 10885 10890 10895 10900 10905 10910 10915 10920 10925 10930 10935 10940 10945 10950 10955 10960 10965 10970 10975 10980 10985 10990 10995 11000 11005 11010 11015 11020 11025 11030 11035 11040 11045 11050 11055 11060 11065 11070 11075 11080 11085 11090 11095 11100 11105 11110 11115 11120 11125 11130 11135 11140 11145 11150 11155 11160 111

TCT GAC ACC CAC TTG CCA ACC CAT TCC GGG AGC CTG TAGCCGTTCC 1348
Ser Asp Thr His Leu Pro Thr His Ser Gly Ser Leu
420 425 430
CTGCTGGTTG AGAGTTGGGG GCTGGGAAGG GCGGGGCCCT GCCTGGGGAT TTCAAGGATG 1408
AGGCCCCAGC ATGGAGGATT GGGGGTAGAA TTCCACCCCTT GAACCCCAGC AAACAGTCCC 1468
TCCCCTGACT CCCACCTTGG TAGGGTGCTG CCTCAGGGAG CCATAAAAGT CGGCTGTGTT 1528
TTGAGACGGC GACAGAACCT GACCCGTGGA GACTGGGAGA GCCCAGCAGG CACCTGTATT 1588
GCAGGGCTCC GACTGCATGT GGCAAGGGCT CCTGGCTGGT CTGGGCCTGA AGGTCTCTCT 1648
CCCAGTGCTC TGTCCCCACT GTTCCTAGCA GACGTATGCT TACCAAGCTG 1697

請求の範囲

1. 配列番号：1で示されるアミノ酸配列の全部又は一部をコードする塩基配列を含むヒト遺伝子。
2. 配列番号：2で示される塩基配列の全部又は一部を含む請求項1記載の遺伝子。
3. 請求項1又は2記載の遺伝子の一部の塩基配列を有することを特徴とする請求項1又は2記載の遺伝子検出用プローブ又はプライマー。

图 1

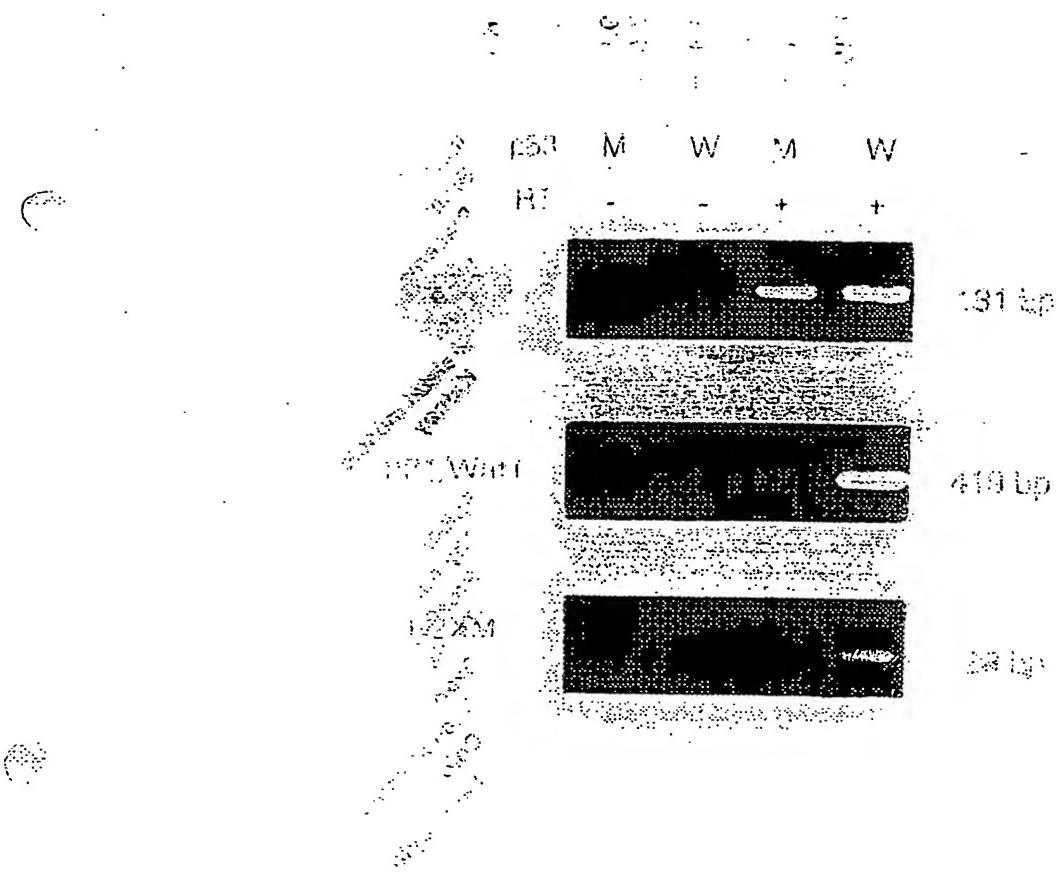


図 2

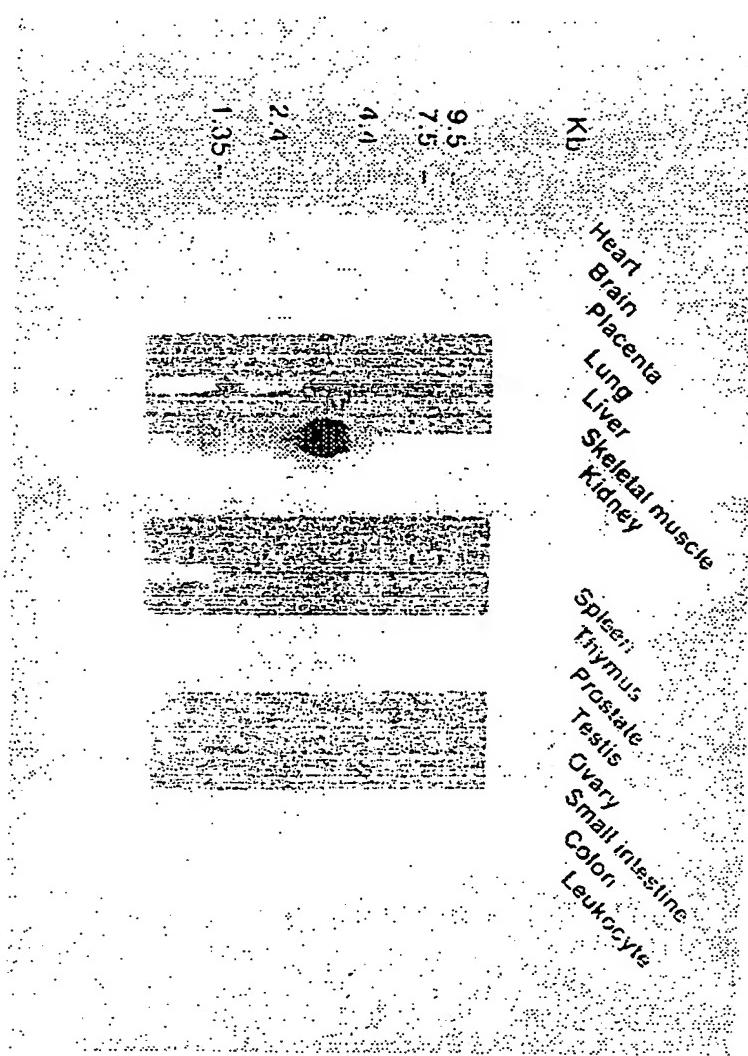
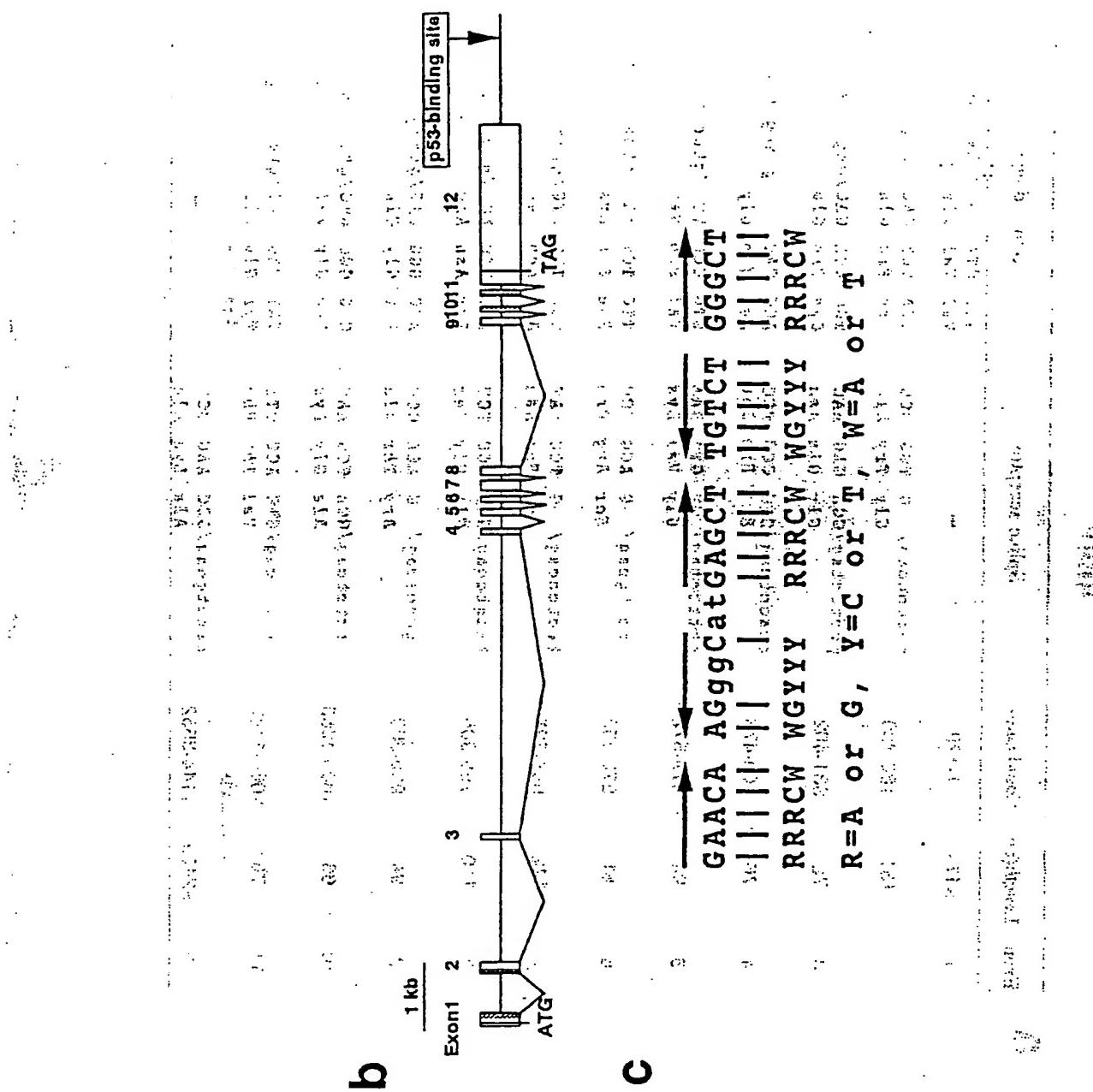


図 3

Exon	Length(bp)	Coordinates	Splice acceptor	Splice donor
1	>179	1-179	-	CTG GTC CC / gtaaggag Val Val Gly
2	151	180-330	cctcccccag / G TGG GCG Gly Try Ala	CCA CCT CAG/gtggggcc Pro Pro Glu
3	72	331-402	gcctccatcg/GCA CAC Gly Glu Asn	TGC CCA GAG/gtgagtttc Cys Pro Glu
4	76	403-478	ccacatcg/CAC CCC TCC His Pro Ser	AGC CAC G /gtaagtgtc Ser His Gly
5	94	479-572	gttttcagg/GT GAA Gly Val Lys	GTC CCG TC /gtaagtgtc Val Pro Ser
6	81	573-653	cacctcgag / G AGG CCC Ser Arg Pro	TTC TCT AA /gtaaggaga Phe Ser Lys
7	142	654-795	tcctccccag / G TCC ATT Ser Asn	GCG TGT CTG /gtgggtccc Ala Leu Leu
8	110	796-905	tatgtcgag/GCT GCC TCT Gly Gly Ser	AAC TTG AG /gtgaggccc Tyr Asn Arg
9	94	906-999	tgcgccacag / G ACA CCC Arg Thr Ala	ACC GGG CAG/gtgggcaca Thr Gly Glu
10	66	1000-1065	ctctctcgag/GCA GGG AAG Ala Gly Lys	CTG GGC GTG /gtgagtgcg Leu Gly Val
11	78	1066-1143	ctctcccg/GTC ACC TTT Val Thr Phe	TAT CAC GAC/gtggactga Tyr Glu Glu
12	>2409	1144-3552	catctcgag/GCC AAG GCC Ala Lys Ala	-

a

図 4



5

三

P210	PPQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	197
P211	PAHDSSSTVWHTHNTPOTOGCCE-PRPGGILQDDSCCTPCAAEAKAQLPRTGCPV-PNGTINPKCILDCMCP3DODDXTS23A4E3D11	198
P212	PPQGCSVSVSIQRIITPSPGIGCDSRASVSSSTSDPDKCQDODGCHGRRTSGV-PYPIHGOSMTCDPQGKQG-TDNNT1656MPEMS11	199
P213	PAQENSLFPTWTHNTPOTOGCCE-PRGTSVSDVCP22PAPG61LTCGCAV-SVQGPPRPAVADLW	200
P214	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	201
P215	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	202
P216	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	203
P217	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	204
P218	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	205
P219	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	206
P220	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	207
P221	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	208
P222	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	209
P223	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	210
P224	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	211
P225	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	212
P226	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	213
P227	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	214
P228	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	215
P229	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	216
P230	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	217
P231	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	218
P232	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	219
P233	PSQGENVFLVWTFNLTVPAPDGGRETFPSPLAQVDPDTPGCGTGTSSVNPEDCSC-NPVSPTLIAQDPLPPI	220

6

P211	-SYHRTATCHEOPGCAARTTULILISRFPIILITGRACKLGLP TAYLIGIGANGLC YTFDOLLLIVDRPEWRTYIPEKAPKATANSVIRPL?	181
P211	PGPNRPARPHVQ -AGCHURRQHLPKVSE HFDLNDGSKICKD DPTMTRIGSC GICFSAVLD DQLLILPARIKOKAFKTAADGPGGEHDOPA-	185
P212	SGHHRFAKXKXINGPPTTFRJKAIS RPDIVYHNGCAGTSUPTIBLAIAISICGSPLOCHILLPDKRKHLYSHAFDPTKPKPSRSPHPVPL	189
P213	PGHHRFAKXKXWKGSEHTRLKAIS RPDIVYHNGCAGTNP TISSVAATSVGTVLDDILNPLKGDHYKARPEETETLIGASTRPPV	194
P214	PGHHRFAKXKXWKGSEHTRLKAIS RPDIVYHNGCAGTNP TISSVAATSVGTVLDDILNPLKGDHYKARPEETETLIGASTRPPV	175
P215	SQHHRFAKXKXWKGSEHTRLKAIS RPDIVYHNGCAGTNP TISSVAATSVGTVLDDILNPLKGDHYKARPEETETLIGASTRPPV	180
P215	SQHHRFAKXKXWKGSEHTRLKAIS RPDIVYHNGCAGTNP TISSVAATSVGTVLDDILNPLKGDHYKARPEETETLIGASTRPPV	186
P216	-GHRTRIANWHAASGESRSRSLKLYC RPDIVYHNGCAGTNP TISSVAATSVGTVLDDILNPLKGDHYKARPEETETLIGASTRPPV	190
P217	PGRHRFAKXKXWKGSEHTRLKAIS RPDIVYHNGCAGTNP TISSVAATSVGTVLDDILNPLKGDHYKARPEETETLIGASTRPPV	179
P218	ALASQARLAELCRSSPPAPPPTAACGOTQTQPCUPCPSSDTDHPBSSL	191
P219	TSTSPLGQEHRTS	191
P219	ALVIGQIPPPSBYSDQOPPPSGCPTLGEAELPAVQSPRCCSISALTEQVOTGGHQHQRPPPEPSQODSTSDDPKGLAQI	199
P219	PASQATWVKQSTDGAYSIGN	172
P215	EHEQERPEDDEPLERPRODQSQELAOASGRKQNSCQVLEPARFCGLRHAIVVQSOILLEPVAT	391
P217	KCPPIVERAPLKLKVSPVDPBPINHDQQLKLSLOQVGCQYPRQDPLPSRISLSEBPPPIPQPPENOLQICVPRSIDSPDPPHQGCCHLPSQ	455
P217	LIPERRALELLCCRAKGQCLITSELPSKIVLSREQLLLTOEPPLAEGAINSIRRCAYRSVATWTPVSQDNADAILPCCRNKRKEPTPATG	486
P217	QISGCKKPYI	586

図 7

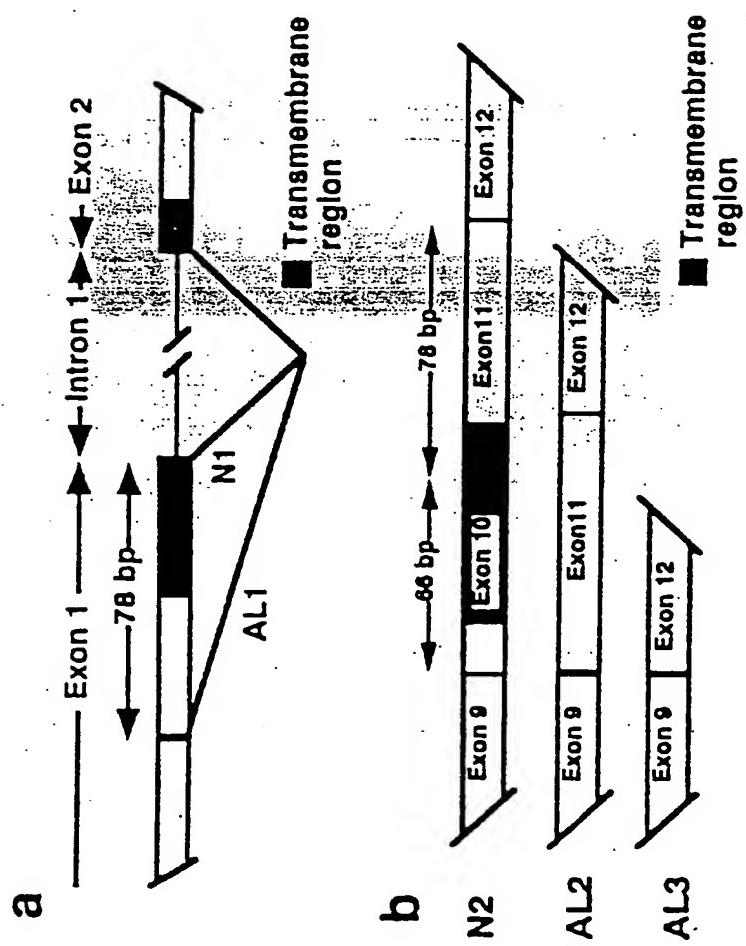


図 8

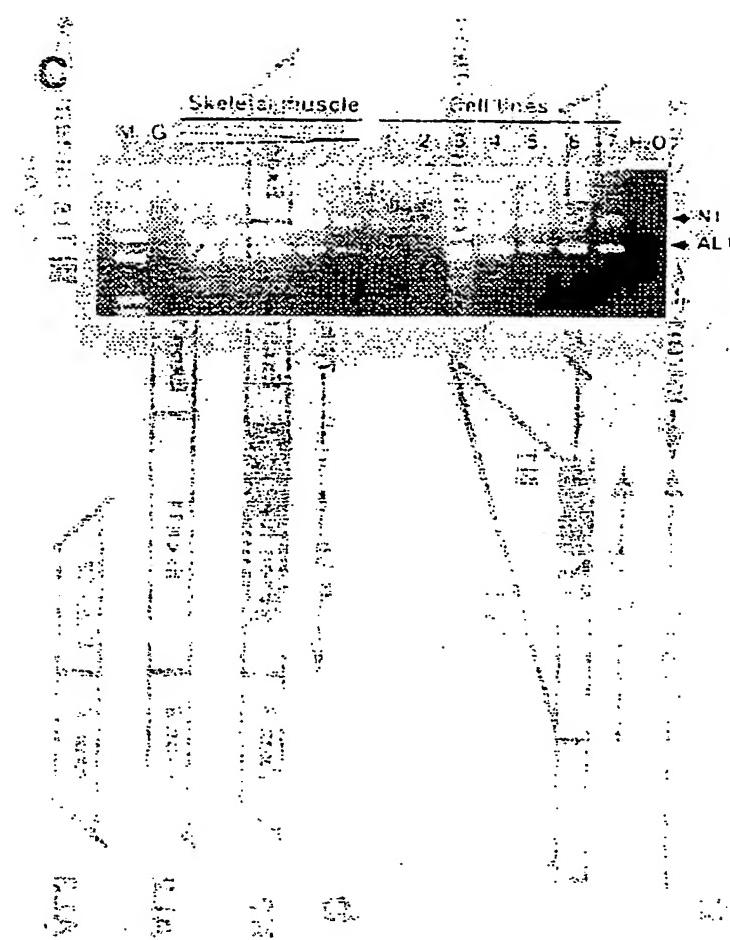


图 9

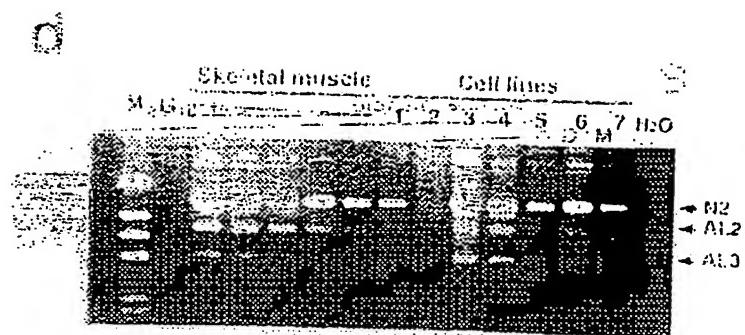


図 10

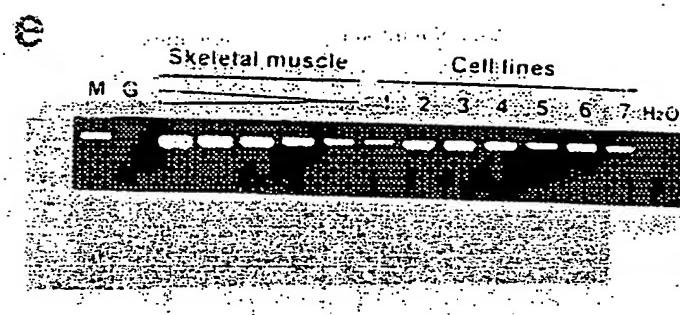
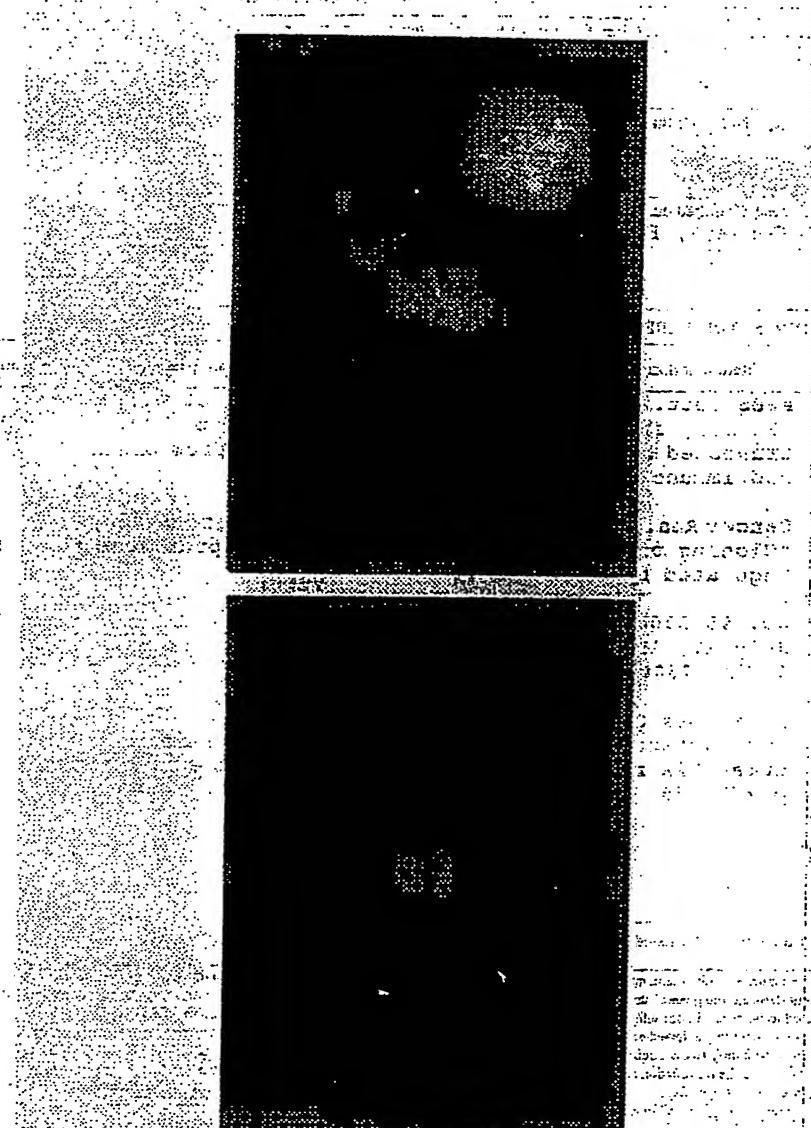


図 11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01146

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl' C12N15/12, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N15/12, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
DDBJ, GenBank, EMBL, GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	FEBS Lett. 418 (1997 Nov.) Khanh-Tuoc Le et al., "Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system." p. 195-199	1-3
P, X	Cancer Res. 57 [15] (1997 Aug.) Tsutomu Urano et al., "Cloning of P2XM, a Novel Human P2X Receptor Gene Regulated by p53" p. 3281-3287	1-3
X	WO, 95/33048, A2 (Glaxo Group Ltd.), July 12, 1995 (12. 07. 95) & EP, 760850, A1 & JP, 10-501122	1-3
X	Receptors Channels 3 [4] (1995) Valera S et al., "Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder" p.283-289	1-3

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "C" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
June 17, 1998 (17. 06. 98)Date of mailing of the international search report
June 30, 1998 (30. 06. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/01146

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl⁶ C12N15/12, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl⁶ C12N15/12, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

DDJ, GenBank, EMBL, GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	FEBS Lett. 418 (1997 Nov.) Khanh-Tuoc Le et al. "Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system." p. 195-199	1-3
P, X	Cancer Res. 57 [15] (1997, Aug.) Tsutomu Urano et al. "Cloning of P2XM, a Novel Human P2X Receptor Gene Regulated by p53" p. 3281-3287	1-3
X	WO, 95/33048, A2 (グラクソ、グループ、リミテッド) 12. 7月. 1995 (12. 07. 9 5) & EP, 760850, A1 & JP, 10-501122, A	1-3

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたものの

「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 08. 98

国際調査報告の発送日

30 jun 1998

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

吉住 和之

印 4B 9548

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文獻の カテゴリ--*	引用文獻名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	Receptors Channels 3 [4] (1995) Valera S et al "Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder" p. 283-289	1 - 3

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1992年7月)